

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-324037

(43) 公開日 平成7年(1995)12月12日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/78	A C B Y	8217-4C		
// A 6 1 K 31/35				
31/70				
C 0 7 D 31/30				

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-64757

(22) 出願日 平成5年(1993)3月1日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年9月29日～
9月30日 日本生薬学会開催の「日本生薬学会 第39回
年会」において文書をもって発表

(71) 出願人 391036518

日本月桃株式会社

沖縄県那覇市久茂地2-8-1

(72) 発明者 奥山 徹

神奈川県川崎市宮前区白幡台1-10-18

(72) 発明者 佐藤 信幸

東京都保谷市本町6-16-6

(72) 発明者 野村 敬一

沖縄県那覇市西2丁目12番1-1303号 フ

ァミール西町ポートサイド

(74) 代理人 弁理士 藤野 清也

(54) 【発明の名称】 月桃から血小板凝集抑制物質の製造法

(57) 【要約】

【構成】 月桃の葉体を酢酸エチルエステルで抽出し、
抽出液をシリカゲルを担体としてn-ヘキサン-酢酸エ
チルエステルを溶媒として濃度勾配クロマトグラフィー
を行って血小板凝集抑制物質を製造する方法。凝集抑制
物質としてクエルセチン及びその配糖体がある。

【効果】 血小板凝集抑制物質を収率よく工業的有利に
採取することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 月桃の葉体を酢酸エチルエステルで抽出し、該抽出液をシリカゲルを担体とし、 n -ヘキサン-酢酸エチルエステル(10:1→1:1)-酢酸エチルエステル-メタノール→80%メタノール水溶液の溶媒で濃度勾配カラムクロマトグラフィーを行って分画し、血小板凝集抑制作用を指標にして血小板凝集抑制作用の高い画分を選択し、該画分から血小板凝集抑制物質を採取することを特徴とする血小板凝集抑制物質の製造法。

【請求項2】 月桃の葉体として乾燥葉体の n -ヘキサン抽出残渣を用いる請求項1記載の製造法。

【請求項3】 血小板凝集抑制物質の採取が、血小板凝集抑制作用の高い画分を n -ヘキサン-酢酸エチルエステルを溶媒として用い濃度勾配シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ってクエルセチンを採取するものである請求項1記載の製造法。

【請求項4】 血小板凝集抑制物質の採取が、血小板凝集抑制作用の高い画分を n -ヘキサン-酢酸エチルエステル(3:1→1:1)-酢酸エチルエステル-メタノールを溶媒として濃度勾配シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、さらにその分画画分のうちで血小板凝集抑制作用の高い画分を選択し、 n -ヘキサン-酢酸エチルエステル(3:1→1:10)-酢酸エチルエステル-メタノール→80%メタノール水溶液を溶媒として用いて濃度勾配シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ってクエルセチンの3位にラムノースが結合した配糖体(クエルシトリン)を採取するものである請求項1記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ショウガ科(Gingiberaceae) *Alpinia* 属に属する月桃から血小板凝集抑制作用の高い物質、特にクエルセチン(Quercetin) 及びその配糖体を収率よく工業的に採取する方法に関する。得られたクエルセチン及びその配糖体は血管透過性を減少させ、血小板凝集抑制作用を有し、医薬品として利用される。

【0002】

【従来の技術】月桃(ゲットウ)は、ショウガ科の*Alpinia* 属に属し、沖縄から九州南端に自生する常緑多年生草本である。従来、その葉体は独特の芳香を有し、葉体から精油を抽出してダニやカビなどの防虫、防黴剤として用いられ、あるいは茎を繊維として利用することが行われていた。本発明者らは、この月桃のさらに高度の利用について検討を行ったところ、その葉体の酢酸エチルエステル抽出物が線溶活性を強く阻害し、血小板凝集抑制作用があることを見出した。そこで、血小板凝集抑制作用を指標にこの抽出物を分画し活性本体を追求したところ、クエルセチン及びその配糖体に高い血小板凝集抑制作用があることを見出した。そしてさらに、月

桃中には、クエルセチン及びその配糖体が多量に含有されており、これを工業的に抽出し、生産できることを見出して本発明を完成するに至った。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】すなわち、本発明は、月桃の葉から血小板凝集抑制物質、特にクエルセチン及びその配糖体を工業的に製造する方法を提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、月桃の葉を酢酸エチルエステルで抽出し、該抽出液をシリカゲルを担体として n -ヘキサン-酢酸エチルエステル(10:1→1:1)-酢酸エチルエステル-メタノール→80%メタノール水溶液の溶媒で濃度勾配カラムクロマトグラフィーを行って分画し、血小板凝集抑制作用の高い画分から血小板凝集抑制物質を採取することによる血小板凝集抑制物質の製造法に関する。さらに、本発明は、上記画分から血小板凝集抑制物質としてクエルセチン及びその配糖体を分画採取する方法に関する。

【0005】月桃は、前記したようにショウガ科の*Alpinia* 属植物であって、月桃(*Alpinia pesionsa* K. Schum.)、タイリン月桃(*Alpinia urarensis* Hay.)、フリリ月桃(*Alpinia sanderae* Sand.)、ヤクチ(*Alpinia oxyphylla* L.)、台湾月桃(*Alpinia* sp.)等が存在する。本発明では、タイリン月桃がクエルセチンの含量が高いので原料として使用することが望ましい。本発明では、これらの月桃の葉体にクエルセチンが含有されているので、葉体を使用する。葉体は、天日乾燥、熱風乾燥等を行なって乾燥して使用することがクエルセチン抽出効率を高めるので望ましい。月桃の葉体は、酢酸エチルエステルで抽出するに先立って前処理として n -ヘキサンで抽出すると、クエルセチンに類似する化合物、その他の不純物を抽出除去することができ、クエルセチンの収率をより一層高めるので望ましい。

【0006】次に、得られた n -ヘキサン抽出残渣を酢酸エチルエステルで抽出する。この抽出は乾燥葉体2kg重量部に対し酢酸エチルエステル12kg～14kgを加えて常温で数時間攪拌抽出する。抽出は数回行なうことが望ましい。このようにするとクエルセチン及びその配糖体がほとんど酢酸エチルエステル中に抽出される。この抽出エキスを線溶活性を強く阻害する作用を示す。そこで、このエキスをそのままあるいは濃縮してシリカゲルカラムを用い n -ヘキサン-酢酸エチルエステル(10:1→1:1)-酢酸エチルエステル-メタノール→80%メタノール水溶液で濃度勾配カラムクロマトグラフィーを用いて分画を行い、血小板凝集抑制作用(PRP-PPP法による)を指標に血小板凝集抑制作用の強い画分を採取する。この画分はそのままあるいはそれを精製して乾燥し、血小板凝集抑制物質として用いる。

【0007】しかし、さらにこの画分(1)をシリカゲルカラムを担体とし、*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステルを溶媒として濃度勾配クロマトグラフィーを行ってクエルセチン含有量の高い画分を分画し、この画分からクエルセチンを結晶として採取する。結晶化には、通常化学物質の結晶化に用いられるどのような方法でも用いることができるが、好ましくは再結晶化する方法が望ましい。また前記画分(1)をシリカゲルカラムを担体として用い*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステル(3:1→1:1)-酢酸エチルエステル-メタノールを溶媒として濃度勾配カラムクロマトグラフィーを行って分画し、その分画面分のうち血小板凝集抑制作用の強い画分を選択し、この画分をさらにシリカゲルカラムを担体として用いて*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステル(3:1→1:10)-酢酸エチルエステル-メタノール-80%メタノール水溶液を溶媒として用いて濃度勾配クロマトグラフィーを行い、この分画面からクエルセチンの3位にラムノースが結合した配糖体を結晶として採取する。結晶化には、通常化学物質の結晶化に用いられるどのような方法でも用いることができるが、好ましくは、メタノールにて再結晶する方法が好ましい。

【0008】本発明の方法で得られる化合物がクエルセチン及びその配糖体であることは、実施例で示すように結晶の融点、MS、¹H-NMR及び¹³C-NMRスペクトルから確認した。また、これらの物質が血小板凝集抑制作用を有し、血小板凝集抑制物質であることは、実施例に示すような測定方法によって確認した。従って、これらの物質は、血小板凝集作用を有する医薬品として有用に利用される。本発明の方法によるとクエルセチンは葉体(乾燥物)当り0.2~0.3%、クエルセチン配糖体を0.3~0.4%採取することができる。

【0009】また、本発明では、シリカゲルを担体として用い前記溶媒を用いて濃度勾配クロマトグラフィーを行ったときにのみクエルセチン及びその配糖体を他の成分から効率よく高い収率で分離することができる。それ以外のカラム、例えばイオン交換樹脂等を用いたりあるいは他の溶剤を用いた場合にはクエルセチン及びその配糖体を収率よく得ることができない。

【0010】本発明で得られた血小板凝集抑制物質、クエルセチン及びその配糖体は、種々の方法により製剤化して脳血栓、動脈硬化、心筋梗塞等の予防あるいは治療*

*に用いることができる。投与量は症状、性別、年齢等において相違するが、成人一日当り1mg~2gを一日一回乃至数回に分けて投与することが望ましい。製剤化は、粉末、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、ローチ剤等として経口的に投与してもよく、また静注、皮下注、筋注等として投与してもよい。さらに、軟膏、貼付剤、座剤等非経口的に投与することもできる。これらの製剤中には必要に応じて製剤上知られている賦形剤、崩壊剤、滑沢剤等種々の添加剤を配合することもできる。さらに、本発明で得られる物質は、食品中に添加して脳血栓の予防あるいは治療効果を持たせた機能性食品を製造することもできる。このような食品には、麺、パン、かまぼこ、ソーセージ、スープ、アイスクリーム、ヨーグルト、ジュース、その他の飲料等がある。【0011】次に実施例及び試験例をあげて本発明を具体的に説明する。

【実施例1】

クエルセチンの採取

タイリン月桃の葉体を採取し、これを天日で乾燥した。その5.1kgに*n*-ヘキサン36リットルを加えて70℃で3時間環流して抽出した。この抽出を3回行い、抽出残渣に酢酸エチルエステル36リットルを加えて60℃で3時間環流して抽出を行った。この抽出を3回行い、抽出液を集めた。この抽出液を減圧下50℃で濃縮乾燥し、濃縮乾燥物501gを得た。この抽出物501gをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分画した。すなわちφ8×90cmのカラムを用いシリカゲルを担体として順次*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステル(10:1→1:1)-酢酸エチルエステル-メタノール-80%メタノールを溶媒として用いて濃度勾配クロマトグラフ処理を行い、フラクション1~100の画分に分画した。そしてこの最初に分画されたフラクション1及び2の画分を再度シリカゲルを担体として*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステルを溶媒として用いて濃度勾配クロマトグラフ処理し、流出液を分取して結晶化させ結晶1gを得た。

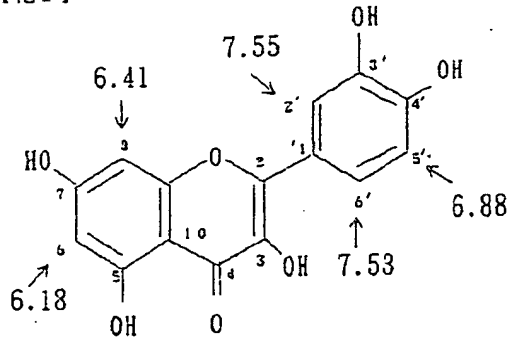
【0012】この結晶は、融点123~125℃(分別)の結晶であってMS(m/z)302を示した。また、¹³C-NMRのスペクトル(DMSO-d₆)は、次のとおりであった。

C-2	146.8	C-1'	122.1
3	135.8	2'	115.2
4	175.8	3'	145.1
5	160.6	4'	147.7
6	98.4	5'	115.7
7	164.0	6'	120.1
8	93.5		
9	156.2		
10	103.1		

5

上記物理化学的性質はクエルセチンの物理化学的性質と一致し、次の構造を示すクエルセチンであることが確認された。

【化1】



〔式中の数値は、クエルセチンの¹H NMRスペクトルのケミカルシフト値 (DMSO-d₆ 溶媒中) を示す。〕

C-2	156.7
3	134.6
4	178.0
5	161.6
6	99.0
7	164.4
8	93.9
9	157.5
10	104.5
1'	121.4
2'	115.9
3'	145.4
4'	148.7
5'	116.1
6'	121.1

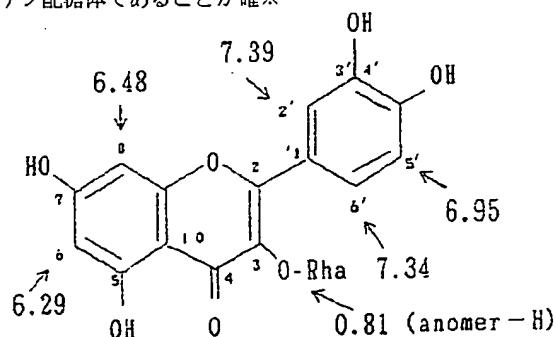
*

C-1"	102.2
2"	70.4
3"	70.8
4"	71.7
5"	70.6
6"	17.8
O-CH ₃	

上記物理化学的性質は、クエルセチンの3位にラムノースがエステル結合した配糖体の物理化学的性質と一致し、次の構造を示すクエルセチン配糖体であることが確認された。

※認された。

【化2】



〔式中の数値は、クエルセチン配糖体 (クエルシトリン) の¹H NMRスペクトルのケミカルシフト値 (DMSO-d₆ 溶媒中) を示す。〕

★【0015】

【実施例3】

★50 クエルセチン及びそのラムノース配糖体のウサギ血小板

凝集抑制作用

実施例1で得られたクエルセチン及び実施例2で得られたラムノース配糖体について血小板凝集に及ぼす影響を測定した。すなわち、PRP-PPP試験の方法に従ってウサギの富血小板血しょう-貧血小板血しょう(platelet rich plasma-platelet poor plasma)を用い、ADP(最終濃度2.0 μ M)を血小板凝集誘発剤(agonist)として用いて血小板凝集抑制能をAggregometer, PAM*

*-ST型にて測定したところ、表1及び図1に示すような血小板凝集抑制能を示し、血小板凝集抑制剤、抗血栓剤、抗動脈硬化剤、脳血栓予防及び治療剤、心筋梗塞予防及び治療剤等として有用に利用されることが判明した。

【0016】

【表1】

化合物	化合物濃度	血小板凝集率(%)
コントロール	0.5mg/ml	0
クエルセチン	0.5mg/ml	-24
配糖体	0.5mg/ml	-90

なお、血小板凝集抑制率は、次の式によって算出した。

血小板凝集抑制率(%) = [(試料の最大凝集能/対照の最大凝集能) - 1] \times 100

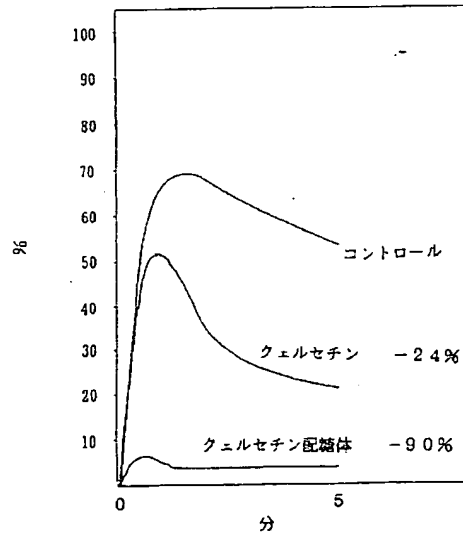
この活性値は、現在血小板凝集抑制剤として使用されて※

※いるアスピリンあるいは薬用ニンジンサボニンの活性値より高い。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例3の血小板凝集能を示す。

【図1】



TRANSLATION

(19) Japan Patent Office (JP)

(12) Japanese Patent Official Gazette (A)

(11) Publication Number: H07-324037

(43) Date of Publication: December 12, 1995

(51) Int.Cl. ⁵	ID	Interoffice File No.	FI	Technology designation
A61K 35/78	ACB Y	8217-4C		

// A61K 31/35

31/70

C 07D 311/30

(21) Patent Application Number: H05-064757

(22) Date of Filing: March 1, 1993

A petition to apply Japanese Patent Law, Article 30.1 was filed. This invention was presented in writing during the 39th Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy.

(71) Applicant: 391036518

Nihon Gettou Co., Ltd.

8-1, Kumochi, Naha, Okinawa, Japan

(72) Inventors: Toru Okuyama

10-18, Shirahatadai 1-chome, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa, Japan

Nobuyuki Sato

16-6, Honcho 6-chome, Hoya, Tokyo, Japan

Keiichi Nomura

Family Nishimachi Port Side, Room No.1303

12-1, Nishi 2-chome, Naha, Okinawa, Japan

(74) Agent

Seiya Tono, Patent Attorney

**(54) PROCESS OF PRODUCING PLATELET AGGREGATION INHIBITING
SUBSTANCE FROM ALPINIA SPECIOSA**

(57) ABSTRACT:

CONSTITUTION:

A process for producing a substance that inhibits platelet coagulation having steps comprising: extraction of a leaf body of *Alpinia speciosa* in ethyl acetate ester; fractionating the extract by the concentration gradient column chromatography utilizing silica gel as carrier and n-hexane ethyl acetate ester as solvent. The aggregation inhibiting substance includes quercetin and its glycoside.

ADVANTAGEOUS EFFECTS

The present invention provides a method of collecting platelet aggregation inhibitor with excellent yield, which is industrially advantageous.

Translator's note:

The specification uses the term "youtai" which may mean "leaf body" or "reticulate". "Reticulate" should correctly be spelled "mou-youtai" (veins of a leaf body) in Japanese, therefore, the translator translated "youtai" as "leaf body."

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A process of collecting a platelet coagulation inhibitor having the steps comprising: extracting a leaf body of *Alpinia speciosa* with ethyl acetate ester; fractionating said elute by concentration-gradient column chromatography with solvent systems [in the order] of n-hexane ethyl acetate ester (10:1→1:1) → ethyl acetate ester → 80% aqueous methanol utilizing silica gel as a carrier; selecting a fraction having high platelet aggregation inhibition activity based on platelet aggregation inhibition activity levels as an index; and collecting the platelet aggregation inhibitor.
2. The process as set forth in Claim 1 wherein said *Alpinia speciosa* leaf body is an n-hexane extraction residue of a dried leaf body.
3. The process of collecting platelet aggregation inhibitor as set forth in Claim 1 wherein said collection of platelet aggregation inhibitor is the collection of quercetin; said quercetin is collected by means of separation of said fraction having a high platelet aggregation inhibition activity by concentration gradient silica gel column chromatography using solvents of n-hexane → ethyl acetate ester.
4. The process of collecting a platelet aggregation inhibitor as set forth in Claim 1 wherein said process has the steps comprising: fractionating said fraction having a high inhibition activity by concentration-gradient silica gel column chromatography using solvents [in the order of] n-hexane ethyl acetate ester (3:1 → 1:1) → ethyl acetate ester → methanol; selecting fractions having a high platelet aggregation inhibition activity from the resulting fractions; and collecting quercitrin (quercetin glycoside), in which rhamnose bonds to the 3rd position of quercetin, by means of separating said selected fractions by concentration gradation silica gel column chromatography using solvents [in the order] of n-hexane-ethyl acetate ester (3:1 → 1:10) →ethyl acetate ester → methanol → 80% aqueous methanol.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0001]

TECHNICAL FIELD

This invention relates to a process of collecting a platelet aggregation inhibitor and its glycoside from *Alpinia* of Zingiberaceae (Gingiberaceae) with an excellent yield of the industrially advantageous level. The resulting quercetin and its glycoside provide a platelet aggregation inhibition activity and reduced vessel permeability, which are useful as drugs.

[0002]

RELATED ART

Alpinia speciosa (gettou) belongs to *Alpinia* of Zingiberaceae, which is an evergreen perennial herb that grows wild in the area covering the Okinawa Island to the southernmost end of Kyushu Island [in Japan]. Conventionally, *Alpinia speciosa* was used as an agent for controlling bugs (e.g. ticks) or fungus (e.g. mold) by extracting refined oil from the leaf body thereof with its distinct aroma. The stem thereof has been used as fibers as well. The inventors carefully studied the advanced areas in which *Alpinia speciosa* could be utilized and found that the extract from the leaf body thereof extracted with ethyl acetate ester strongly inhibits fibrinolytic activities and inhibits platelet aggregation. The inventors further studied ways to fractionate this extract using platelet aggregation inhibition activity as an index and found that quercetin and its glycoside provide very strong platelet aggregation inhibition activity. The inventors also found that *Alpinia speciosa* contains a large amount of quercetin and its glycoside, which can be produced by an industrially advantageous extraction method. The present invention is thus completed.

[0003]

OBJECT OF THE INVENTION

That is, the object of the invention is to provide a method of manufacturing from the leaf body of *Alpinia speciosa*, a platelet aggregation inhibitor, more specifically, quercetin and its glycoside, in an industrially advantageous manner.

[0004]

MEANS TO ACHIEVE THE OBJECTIVE

This invention provides a process of collecting a platelet coagulation inhibitor having the steps comprising: extraction of a leaf body of *Alpinia speciosa* with ethyl acetate ester; fractionating the extract by concentration gradient column chromatography with solvent systems

[in the order] of n-hexane-ethyl acetate ester (10:1→1:1) → ethyl acetate ester → methanol → 80% aqueous methanol utilizing silica gel as a carrier; selecting a fraction having high platelet aggregation inhibition activity; and collecting the platelet aggregation inhibitor. The present invention further provides a method of further fractionating the fraction to obtain quercetin and its glycoside as platelet aggregation inhibitor.

[0005]

As described above, *Alpinia speciosa* is a plant that belongs to *Alpinia* of Zingiberaceae, which includes *Alpinia speciosa* [typo: original text reads “pecionsa”] K. Schum., *Alpinia urarensis* Hay, *Alpinia sanderae* Sand, *Alpinia oxyphylla* L., *Alpinia* sp. and the like. Among all, *Alpinia urarensis* Hay contains a large amount of quercetin, which makes this species a desirable starting material. Quercetin is contained in leaf bodies thereof, therefore, quercetin was prepared from leaf bodies in the present invention. To enhance efficiency of extraction, sun drying or hot air drying of leaf bodies is desirable. Performing pre-extraction of *Alpinia speciosa* leaf body with n-hexane before ethyl acetate ester extraction is also desirable because this treatment removes impurities such as quercetin - like compounds and some other types. Accordingly, this pre-extraction increases the yield of quercetin.

[0006]

Next, the resulting n-hexane extract residue is extracted with ethyl acetate ester. 12kg-14kg of ethyl acetate ester by weight part per 2kg of dry leaf body is added to the extract and stirred at room temperature for several hours. Desirably, the n-hexane extract residue should be extracted several times. Quercetin and its glycoside are extracted in the ethyl acetate ester most completely in this way and the extract inhibits strong fibrinolytic activities. The extract may be used as it is or condensed and fractionated by the silica gel concentration gradient column chromatography with solvents [in the order] of n-hexane - ethyl acetate ester (10:1→ 1:1) → ethyl acetate ester → methanol → 80% aqueous methanol using the platelet aggregation inhibition activity (by the PRP-PPP method) as an index to collect a fraction having a strong platelet aggregation inhibition activity. This fraction is, then, used as a platelet aggregation inhibitor as it is or refined and dried to serve the purpose.

[0007]

Alternately, the above Fraction (I) is fractionated by concentration gradient chromatography in solvents of n-hexane → ethyl-acetate ester, using silica gel column so as to obtain a fraction having a high quercetin content, followed by collection of quercetin in the form

of crystals. Any methods normally used for crystallization of chemicals may be used for this crystallization; however, a method of recrystallization is more desirable. Moreover, Fraction (I) may be further fractionated by concentration gradient chromatography with a silica gel column utilizing solvents [in the order of] n-hexane - ethyl acetate ester (3:1 → 1:1) → ethyl acetate ester → methanol; selecting a fraction having high platelet aggregation inhibition activity from the resulting fractions; and collecting quercitrin in the crystalline form wherein rhamnose bonds to the 3rd position of quercetin by means of separating the selected fraction by concentration-graduation silica gel column chromatography using solvents [in the order of] n-hexane- ethyl acetate ester (3:1 → 1:10) → ethyl acetate ester → methanol → 80% aqueous methanol. Any methods normally used for crystallization of chemicals can be used for this crystallization. Yet, methanol is used herein.

[0008]

The melting point, MS ¹H-NMR, and ¹³C-NMR spectra of the crystals confirmed that the compounds obtained by the method of the present invention is quercetin and its glycoside as demonstrated in Examples below. Measurement methods illustrated in Examples below also confirmed that the resulting substances are platelet aggregation inhibitors having such platelet aggregation inhibition activity. These substances are thus useful as drugs that have platelet aggregation inhibition activity. The method of the present invention can yield quercetin at 0.2 - 0.3% of (dried) leaf body, and a quercetin glycoside at 0.3 to 0.4%.

[0009]

In the present invention, quercetin and its glycoside can be separated from other components at a high yield only by means of concentration gradient chromatography in which silica gel is used as a carrier utilizing the above solvents. Other types of means that use ion-exchange resins or other solvents in columns do not provide quercetin and its glycoside at a high yield.

[0010]

A platelet aggregation inhibitor obtained by this invention, which is quercetin or its glycoside, can be pharmaceutically prepared by a variety of methods for use in prevention or treatment of cerebral thrombosis, arteriosclerosis, myocardial infarction, and the like. Dosages may be changed in accordance with symptom, sex, age, and the like; however, a desirable dosage for an adult patient is 1 mg - 2g per day wherein the daily dosage should be divided into 1 - several portions for each administration. The substance may be pharmaceutically prepared for

oral administration in the form of powder, granule, tablet, capsule, syrup, or troche, or for parenteral administration in the form of intravenous injection, a subcutaneous injection, intramuscular injection, and the like. It may also be prepared for parenteral administration in the form of ointment, patches, suppository, and the like. Various additives (e.g. excipient, disintegrator, lubricant) may also be added to the preparation on an as needed basis.

Furthermore, the substance obtained by this invention may be added to foods to give function such as prevention or treatment of cerebral thrombosis. Such function enhanced foods include noodles, breads, fish cakes, sausages, soups, ice creams, yogurts, juices or other drinks and the like.

[0011]

Next, examples of the present invention are described more concretely with reference to test examples.

EXAMPLE 1

COLLECTION OF QUERCETIN

Leaf bodies of *Alpinia urarensis* Hay were collected and dried under the sunlight. 36 liters of n-hexane were added to 5.1kg of the leaf bodies, and the mixture was refluxed at 70 °C 3 hours for extraction. The extraction was performed 3 times. 36 liters of ethyl acetate ester was further added to the residue and the mixture was refluxed at 60 °C for 3 hours for extraction. The extraction was performed 3 times and the extracts were collected. The extracts were vacuum dried to be concentrated at 50 °C, yielding 501g of concentrated dry substance. The extract of 501g was fractionated by the silica gel column chromatography. In other words, using the Ø 8 x 90cm column containing a silica gel carrier, the extract was fractionated to 1 – 100 fractions by concentration gradient chromatograph using solvents arranged in the order of n-hexane - ethyl acetate ester (10:1→1:1) → ethyl acetate ester → methanol → 80% aqueous methanol. Then, Fraction 1 and Fraction 2, the earliest fractions, were fractionated again by concentration gradient silica gel chromatograph using n-hexane - ethyl acetate ester solvent. The effluent was collected and crystallized to give 1g of crystals.

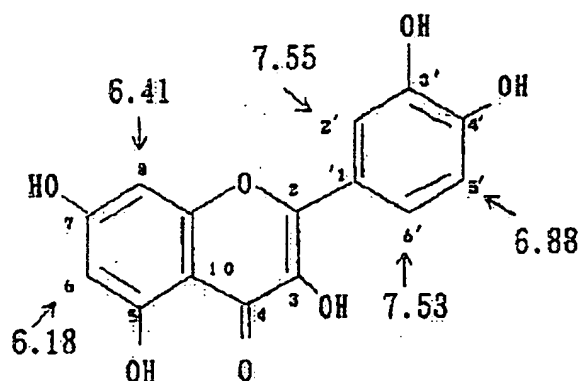
[0012]

The resulting crystals had a melting point of 123-125 °C (decomposition) and MS (m/z) of 302. The ¹³C-NMR spectrum (DMSO-d₆) was as follows:

C-2	146.8	C-1'	122.1
3	135.8	2'	115.2
4	175.8	3'	145.1
5	160.6	4'	147.7
6	98.4	5'	115.7
7	164.0	6'	120.1
8	93.5		
9	156.2		
10	103.1		

The physio-chemical property of the above substance was identical to that of quercetin. It was confirmed that the substance was quercetin having the following chemical structure.

FORMULA 1



wherein numerical values shown in the above formula are the chemical shift (DMSO-d₆) values of the ¹H NMR spectrum of quercetin. Yield: 0.01% of dried leaf body.

[0013]

EXAMPLE 2

COLLECTION OF QUERCETIN GLYCOSIDE

Fraction 9 obtained by the method of Example 1 of a quercetin glycoside was applied to silica gel column to perform concentration gradient chromatography using solvents arranged in the order of n-hexane - ethyl acetate ester (3:1 → 1:1) → ethyl acetate ester → methanol to give Fractions 1-30. Fractions 17-21 were then applied to silica gel column to elute using solvents arranged in the order of n-hexane - ethyl acetate ester (3:1 → 1:10) → methanol → 80% aqueous methanol. The eluate was allowed to stand. The resulting crystals were collected by decantation

and recrystallized in methanol to give Crystal 2.

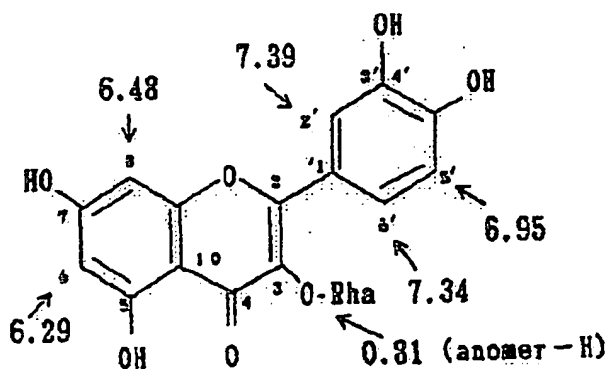
[0014]

Crystal 2 had a melting point of 177-180 ° C (dec) and MS (m/z) of 488. Its ^{13}C -NMR spectrum (DMSO-d₆) values were as follows:

C-2	156.7	C-1''	102.2
3	134.6	C-2''	70.4
4	178.0	3''	70.8
5	161.6	4''	71.7
6	99.0	5''	70.6
7	164.4	6''	17.8
8	93.9	O-CH ₃	
9	157.5		
10	104.5		
1'	121.4		
2'	115.9		
3'	145.4		
4'	148.7		
5'	116.1		
6'	121.1		

The physio-chemical property of the above substance was identical to that of a glycoside having rhamnose binding to the 3rd position of quercetin. It was confirmed that the substance was quercetin glycoside having the following chemical structure.

FORMULA 2



wherein numerical values shown in the above formula is the chemical shift (DMSO-d₆) values of the ^1H NMR spectrum of quercetin glycoside.

[0015]

EXAMPLE 3

EFFECT OF QUERCETIN AND ITS RHAMNOSE GLYCOSIDE ON RABBIT PLATELET AGGREGATION

The effect of quercetin obtained in Example 1 and rhamnose glycoside obtained in Example 2 on platelet aggregation were analyzed herein. In other words, rabbit platelet rich plasma-platelet poor plasma was introduced to analyze platelet aggregation inhibition ability by aggregometer (PAM-8T) using ADP (final concentration 2.0 μ M) as an agonist in accordance with the PRP-PPP test method. Table 1 and Figure 1 illustrate the platelet aggregation inhibition abilities, indicating that quercetin and the rhamnose glycoside are useful as a platelet aggregation inhibitor, antithrombotic agent, anti-arteriosclerosis agent, cerebral thrombosis prevention or treatment agent, myocardial infarction prevention or treatment agent.

[0016]

TABLE 1

Compound	Compound concentration	Platelet aggregation ratio (%)
Control	0.5 mg/ml	0
Quercetin	0.5 mg/ml	-24
Glycoside	0.5 mg/ml	-90

The platelet aggregation inhibition ratio was computed by the following equation:

Platelet aggregation inhibition ratio (%) =

$$[(\text{max. aggregation ability of sample} / \text{max. aggregation ability of control}) - 1] \times 100.$$

These activity values are higher than that of aspirin, currently being prescribed as a platelet aggregation inhibitor, or a medicinal ginseng saponin.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 illustrates the platelet aggregation inhibition abilities demonstrated in Example 3.

FIGURE 1

